ELP_{30}-tag 蛋白纯化能力的原核表达研究*

陈远侨[1] 龙定沛[2] 豆晓雪[1] 祁润[1] 赵爱春[1,2]**

（1 西南大学 生物技术学院，重庆 400716；

2 家蚕基因组生物学国家重点实验室，重庆 400716）

摘要 目的：探究一种小分子量类弹性蛋白标签（elastin-like protein tag，ELP tag）——ELP_{30}-tag 在原核表达系统中的蛋白纯化能力。方法：人工合成 *ELP_{30}-tag* 基因并将其构建于 pET-28a(+)载体，结合 2 种内含肽（*intein1* 和 *intein2*）基因和增强型绿色荧光蛋白（enhanced green fluorescent protein，eGFP）基因，构建 4 个含有不同元件序列的原核表达载体：pET-ELP_{30}、pET-ELP_{30}-eGFP、pET-ELP_{30}-intein1-eGFP 和 pET-eGFP-intein2-ELP_{30}；将表达载体转化大肠杆菌 BL21（DE3），经 IPTG 诱导重组蛋白表达，并通过可逆相变循环（inverse transition cycling，ITC）纯化重组蛋白 ELP_{30}、ELP_{30}-eGFP、ELP_{30}-intein1-eGFP 和 eGFP-intein2-ELP_{30}，随后通过调节溶液 pH 值或添加二硫苏糖醇（DL-Dithiothreitol，DTT）分别诱导 intein1 和 intein2 断裂，最后再经 ITC 分离获得纯 eGFP。结果：利用设计的 ELP_{30}-tag 成功纯化获得了重组蛋白 ELP_{30}、ELP_{30}-eGFP 和 eGFP-intein2-ELP_{30}；重组蛋白 ELP_{30}-intein1-eGFP 和 eGFP-intein2-ELP_{30} 中的内含肽可经诱导发生断裂而释放 eGFP，但未能分离获得纯 eGFP。本研究为小分子量 ELP-tag 的运用和优化设计奠定了一定基础。

关键词 类弹性蛋白 内含肽 增强绿色荧光蛋白 原核表达 蛋白质纯化

类弹性蛋白（elastin-like protein，ELP）是一种化学合成或利用基因工程技术合成的温敏多肽[1,2]。在水溶液中，ELP 低温可溶，当溶液升温并超过 ELP 的相变温度（Transition temperature ，Tt）后，ELP 分子构象变化，疏水聚集，迅速从溶液中析出；溶液降温（T<Tt）后，ELP 分子可恢复为溶解状态，ELP 的这一性质被称为可逆相变（inverse transition），多数 ELP 重组蛋白都具有这一特性[3][4]，并且能通过可逆相变循环（inverse transition cycling，ITC）进行纯化：

*国家蚕桑产业技术体系（CARS-18-ZJ0201）项目资助
**通讯作者，电子邮箱：zhaoaichun@hotmail.com；zhaoaichun@swu.edu.cn

升温或将 ELP 的 Tt 降低至室温以下（T>Tt），触发样品溶液中 ELP 重组蛋白相变析出，再通过离心或过滤等方式从样品中分离得到 ELP 重组蛋白，并用低温（T<Tt）缓冲液溶解，重复上述操作，直至重组蛋白纯度较为理想[3]。

1996 年，McPherson 等[4]首次在大肠杆菌中成功表达并通过 ITC 纯化得到 ELP，进一步，Meyer 等[3]在原核表达体系中利用 ELP-tag 纯化得到 ELP 重组蛋白。2005 年，Banki 等[5]首次将具有自切割功能的内含肽（intein）和 ELP 联合使用，构成 ELP-intein 标签（EI tag），带有 EI tag 的重组蛋白可先通过 ITC 纯化，再诱导 intein 断裂，释放与 EI tag 融合表达的目的蛋白，最后通过 ITC 去除 EI tag，获得目的蛋白。相比于 His-tag 等常用的蛋白纯化标签，ELP-tag 蛋白纯化体系无需树脂基质，成本低廉，操作简单且易于放大，商业化前景良好[6,7]。目前，ELP 较为常用的类型是（Val-Pro-Gly-Xaa-Gly）$_n$，n 代表重复数，Xaa 代表除 Pro 外的任意氨基酸。Meyer 等[3]以 Val、Ala 和 Gly 替代 Xaa，三种氨基酸比例为 5：2：3（Xaa=$V_5A_2G_3$）设计出一系列长度不等的 ELP-tag，这种 ELP-tag 已在大肠杆菌、酵母、烟草和水稻等表达系统中得到广泛应用[5,8-11]。ELP 的 Tt 值随 n 值增大而降低[3]，为取得合适的 Tt 值，以利于蛋白表达和 ITC 纯化，目前所报道的此类设计的 ELP tag 普遍较大，序列重复数 n 可达 60、90 甚至更大[5,10,11]。作为蛋白纯化标签，此类设计的 ELP tag 过大，因此仍需对小分子量 ELP tag 的蛋白纯化能力进行探索和优化。

本研究利用大肠杆菌原核表达系统验证了 ELP_{30}-tag（Xaa=$V_5A_2G_3$，n=30，Mw=13.3 kDa）的蛋白纯化能力，利用 ELP_{30}-tag 成功纯化得到除 ELP_{30}-intein1-eGFP 外的重组蛋白，同时结合 intein 元件，构建了 EI tag，实现了目的蛋白的释放，为小分子量 ELP tag 及衍生的 EI tag 的运用和进一步优化设计奠定了一定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 Trans1-T1 和 BL21（DE3）购自北京全式金生物技术有限公司；质粒 pET-28a（+）购自 Novagen 公司；带有两段不同内含肽基因（*intein1*、*intein2*）的质粒 pTWIN1 购自 NEB 公司；携带 *eGFP* 基因的质粒 pSL-ELP_{30}-intein1-eGFP 由本实验室保存；*ELP_{30}* 基因参考 Meyer 等[3]的设计（Xaa=$V_5A_2G_3$，n=30），并

在 5′端和 3′端分别设计有 *Xho*I 和 *Kpn*I 酶切位点，由南京金斯瑞公司合成并克隆至 pUC-57 载体。

1.1.2 引物

实验中用到的引物见表 1，由生工生物工程（上海）有限公司合成。

表 1 目的片段扩增所用的引物

Table 1 Primers for fragments amplification

引物名称	序列（5′-3′）
F_1	ACATgcatgcAAGGAGATGGCGCC
R_1	CCGctcgagggatccgcatgcggtaccgtcgacCATTATATCTCCTTCTTAAA
eGFP-F_1	GGggtaccAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
eGFP-R_1	CGggatccCTTGTACAGCTCGTCCATGC
eGFP-F_2	GCtctagaAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
eGFP-R_2	GCATGGACGAGCTGTACAAGTGCATCACGGGAGATGCACT
intein2-F	AGTGCATCTCCCGTGATGCACTTGTACAGCTCGTCCATGC
intein2-R	CCGctcgagGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTAGCGTGGCTGACGAACCCGT

1.1.3 主要试剂

酵母提取物、胰蛋白胨购自 Oxoid 公司；限制性内切酶、Ex-Taq DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司；IPTG（isopropy-β-D-thiogalactoside）、硫酸卡那霉素（Kan）、氨苄青霉素（Amp）购自生工生物工程（上海）有限公司；Trans2K Plus DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司；Ni-NTA 亲和层析介质购自南京金斯瑞公司；二硫苏糖醇（DL-Dithiothreitol，DTT）、PMSF（Phenylmethylsulfonyl fluoride）、His-tag 抗体、GFP 抗体、Western 二抗购自碧云天公司；Western 显色液购自 Roche 公司；胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Omega 公司；片段纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司；针式滤膜 Millex-GV（0.22 μm）购自 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组表达载体的构建

以 pET-28a（+）质粒作为模板，以 F_1 和 R_1 为引物，PCR 扩增载体表达框的同源片段，该片段在 5′端存在 *Sph*I 酶切位点，在 3′端编码起始氨基酸的 ATG 后依次引入 *Sal*I、*Kpn*I、*Bam*HI和 *Xho*I等酶切位点将载体原有多克隆位点替换，便于后述重组表达载体的构建。将 PCR 产物用 *Sph*I和 *Xho*I双酶切，胶回收该片段并连接至同样双酶切后的 pET-28a（+）载体中，经测序验证，选取序列正确

的克隆提取质粒并命名为 pET-28a′（图 1a）。

用 *Xho*I、*Kpn*I双酶切 pUC-ELP$_{30}$ 质粒，胶回收纯化 *ELP$_{30}$* 基因片段并连接至经 *Sal*I（与 *Xho*I 互为同尾酶）和 *Kpn*I双酶切后的 pET-28a′载体中，经测序验证，选取序列正确的克隆提取质粒并命名为 pET-ELP$_{30}$（图 1a）。

以 pSL-ELP$_{30}$-intein1-eGFP 质粒作为模板，以 eGFP-F$_1$、eGFP-R$_1$ 为引物，通过 PCR 得到 *eGFP* 基因片段，用 *Kpn*I和 *Bam*HI双酶切 PCR 产物并连接至同样双酶切后的载体 pET-ELP$_{30}$，经测序验证，选取序列正确的克隆提取质粒并命名为 pET-ELP$_{30}$-eGFP（图 1a）。

用 *Xho*I、*Bam*HI 双酶切 pSL-ELP$_{30}$-intein1-eGFP 质粒，胶回收得到 *ELP$_{30}$-intein1-eGFP* 基因片段并连接至同样双酶切后的载体 pET-28a′中，经测序验证，选取序列正确的克隆提取质粒并命名为 pET-ELP$_{30}$-intein1-eGFP（图 1a）。

以 pSL-ELP$_{30}$-intein1-eGFP 质粒作为模板，以 eGFP-F2、eGFP-R2 为引物，通过 PCR 获得 *eGFP* 基因片段；以 pTWIN1 质粒为模板，intein2-F 和 intein2-R 为引物，通过 PCR 得到 *intein2* 基因片段。引物设计时，在上述两个基因片段间引入了长 40 bp 的互补序列，可通过融合 PCR 技术[12]得到一段 *eGFP-intein2* 融合基因，用 *Xba*I和 *Xho*I双酶切后与 *ELP$_{30}$* 基因片段共同连入用 *Xba*I和 *Kpn*I双酶切的 pET-28a′载体中，经测序验证，选取序列正确的克隆提取质粒，命名为 pET-eGFP-intein2-ELP$_{30}$（图 1a）。进一步，所有重组载体用 *Sph*I和 *Xho*I双酶切验证，确保重组载体构建成功。

1.2.2 重组蛋白的诱导表达

将 pET-ELP$_{30}$、pET-ELP$_{30}$-eGFP、pET-ELP$_{30}$-intein-eGFP 和 pET-eGFP-intein2-ELP$_{30}$ 等四个重组质粒分别转化感受态大肠杆菌 BL21（DE3），涂布含 50 μg/mL Kan LB 平板，37°C生长 10 h，挑取单菌落，用 5 mL 液体 LB 培养基（Kan，50 μg/mL）过夜活化，以 1:100 比例接种至 100 mL 液体 LB 培养基（Kan，50 μg/mL），37°C培养至 OD_{600}=0.6~0.8，加入终浓度 0.5 mmol/L IPTG，25°C过夜诱导。10000×*g*，离心 2 min 收集菌体。转入质粒 pET-ELP$_{30}$、pET-ELP$_{30}$-eGFP 和 pET-eGFP-intein2-ELP$_{30}$ 的 3 组诱导菌体用冰上预冷的磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline，PBS，pH 7.0）洗涤，1/5 原培养基体积（20 mL PBS）重悬，－80°C冻存备用；转入质粒 pET-ELP$_{30}$-intein1-eGFP 的诱导菌体用冰上遇冷的 Buffer A（20 mmol/L Tris-HCl，500 mmol/L NaCl，pH 8.5）洗涤，1/5

原培养基体积（20 mL Buffer A）重悬，－80℃冻存备用。

1.2.3 重组蛋白的纯化

将菌液置冰上解冻后加入终浓度 1 mmol/L PMSF 蛋白酶抑制剂，超声（功率 200 W，破碎 1 s 停 3 s）至菌液澄清透亮，16000×g，4℃离心 15 min，将上清液用 0.22 μm 针式滤膜过滤备用。蛋白纯化方法为多次 ITC，直至目的蛋白的纯度较为理想，单次的 ITC 操作如下：向 5 mL 菌体破碎上清中加入 NaCl 粉末至终浓度 4 mol/L，吸入注射器中，室温静置 5 min，观察到明显的浑浊后，过孔径 0.22 μm 针式滤膜截留 ELP 重组蛋白，对于重组蛋白 ELP_{30}、ELP_{30}-eGFP 和 eGFP-Intein2-ELP_{30}，注入 2 mL PBS（室温，含 4 mol/L NaCl）洗涤滤膜，用 1 mL 冰上预冷的 PBS 洗脱；对于重组蛋白 ELP_{30}-intein1-eGFP，注入 2 mL Buffer A（室温，含 4 mol/L NaCl）洗涤滤膜，用 1 mL 冰上预冷的 Buffer A 洗脱。每个样品各进行三次 ITC 操作，最后一次 ITC 操作时，重组蛋白均以 500 μl 冰上预冷的 PBS 洗脱，取样进行 SDS-PAGE 和 Western blotting（WB）分析，检测重组蛋白的纯化情况。

1.2.4 诱导内含肽断裂

使 ELP_{30}-intein1-eGFP 纯化产物 4℃静置 20 h，诱导 intein1 的 C 端肽键断裂；向 eGFP-intein2-ELP_{30} 纯化产物中加入终浓度 50 mmol/L 的 DTT，4℃静置 20 h，诱导 intein2 的 N 端肽键断裂。反应完成后，加入终浓度 4 mol/L 的 NaCl，吸入注射器中，室温静置 5 min，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，4℃保存滤液；用 2 mL PBS（室温，含 4 mol/L NaCl）洗涤滤膜，500 μl 冰上预冷的 PBS 洗脱膜上截留的蛋白，4℃保存洗脱液，对上述滤液和洗脱液取样进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测分析。

1.2.5 重组蛋白纯化产物荧光活性检测

融合有 eGFP 的重组蛋白（ELP_{30}-eGFP、ELP_{30}-intein1-eGFP 和 eGFP-intein2-ELP_{30}）纯化产物各取 10 μl，用 PBS 作为阴性对照，在荧光显微镜下观察激发荧光，检测重组蛋白纯化产物的荧光活性。

2 结果

2.1 重组质粒酶切鉴定

四个重组质粒上的基因片段均介于 T7 启动子（T7 promoter）上游 *Sph*I位点与多克隆位点处最末位的 *Xho*I 位点之间，将所有重组质粒以 *Sph*I和 *Xho*I 双酶切

后的电泳结果如图 1b 所示，其中 pET-28a′（5254 bp，酶切结果理论值：321 bp、4933 bp）、pET-ELP30（5704 bp，酶切结果理论值：771 bp、4933 bp）和 pET-ELP30-eGFP（6472 bp，酶切结果理论值：1539 bp、4933 bp）为两个片段；由于 pET-ELP30-intein1-eGFP（6949 bp）存在两个 *Sph*I 位点，pET-eGFP-intein2-ELP30（7036 bp）存在两个 *Xho*I 位点，因此两者的酶切产物呈现为三个片段，前者的酶切结果理论值为 750 bp、1266 bp 和 4933 bp，后者的酶切结果理论值为 462 bp、1641 bp 和 4933 bp。所有表达载体的酶切结果符合预期，且测序无误，表明四个表达载体构建成功。

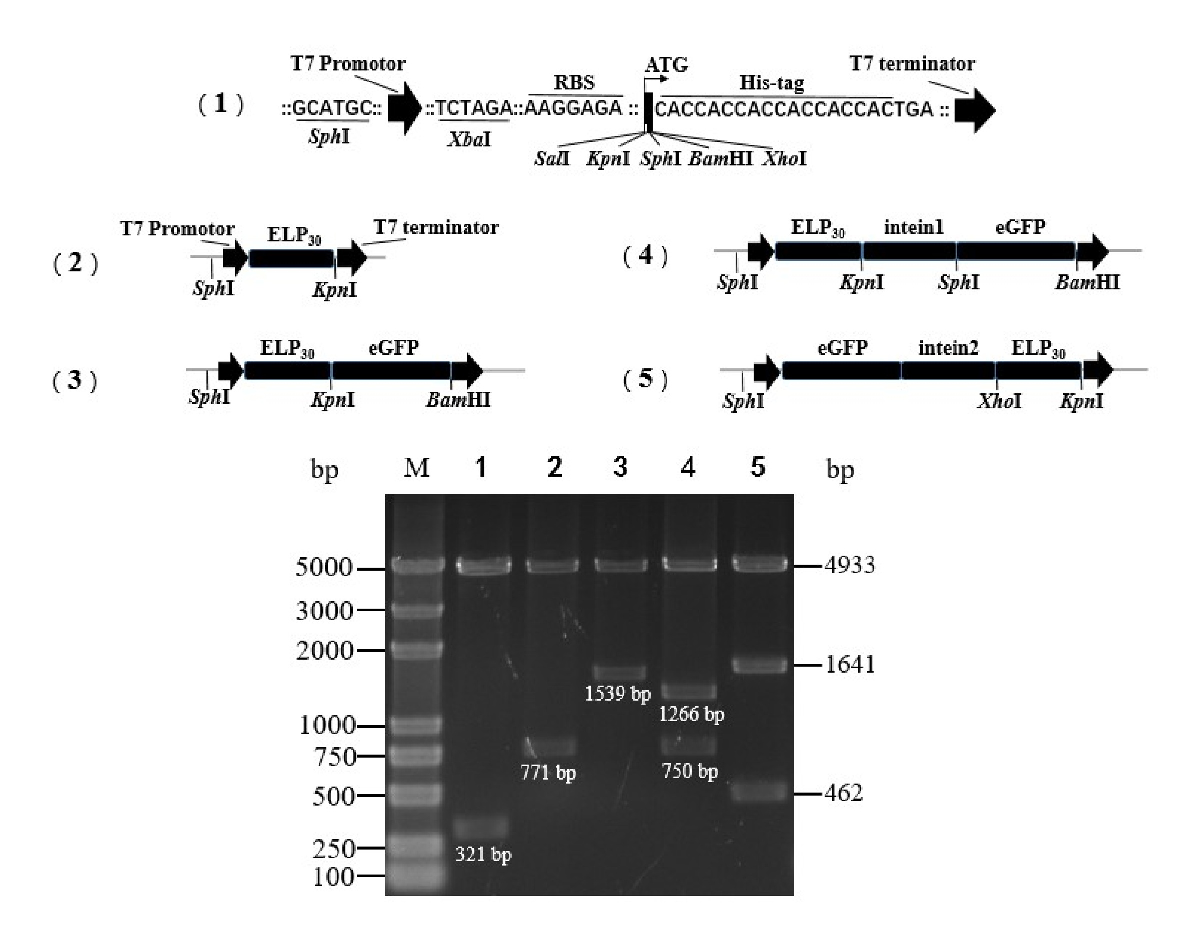


图 1 表达载体的构建

Fig.1 Construction of expression vectors

(a) The expression cassettes of designed expression plasmids.

(b) Identification of recombinant plasmids by *Sph*I & *Xho*I

1: pET-28a′; 2: pET-ELP30; 3: pET-ELP30-eGFP;

4: pET-ELP30-intein1-eGFP; 5: pET-eGFP-intein2-ELP30

2.2 重组蛋白纯化检测

2.2.1 ELP30 和 ELP30-eGFP 纯化检测

ELP_{30}（13.3 kDa）和 ELP_{30}-eGFP（41.2 kDa）纯化产物经 SDS-PAGE 检测，Band Scan 5.0 软件分析，条带纯度均达 98%，BCA 法测得蛋白浓度分别为 0.18 mg/mL 和 0.44 mg/mL（见表 2），并且 ELP_{30}-eGFP 纯化产物肉眼可见绿色荧光，在激发光下荧光明亮（图 5B）。其中，ELP_{30} 的电泳条带（图 2 泳道 2）略大于蛋白 maker 中代表 15 kDa 的蛋白条带，这也是 ELP 在蛋白电泳检测时的常见现象[3,4,13]。此外，所有重组蛋白在 C 端融合表达了一段载体序列编码的 His-tag，可用于 Western blotting 检测和重组蛋白的纯化，图 2 泳道 4 是使用 His-tag 纯化得到的 ELP_{30}-eGFP，经软件分析，条带纯度达 98%。在 SDS-PAGE 检测水平，His-tag 与 ELP_{30}-tag 对 ELP_{30}-eGFP 的纯化效果相当，但以 His-tag 抗体为一抗的 Western blotting 结果显示 His-tag 纯化得到的 ELP_{30}-eGFP 纯化产物出现多条杂交信号，表明 ELP_{30}-tag 的蛋白纯化效果优于 His-tag。

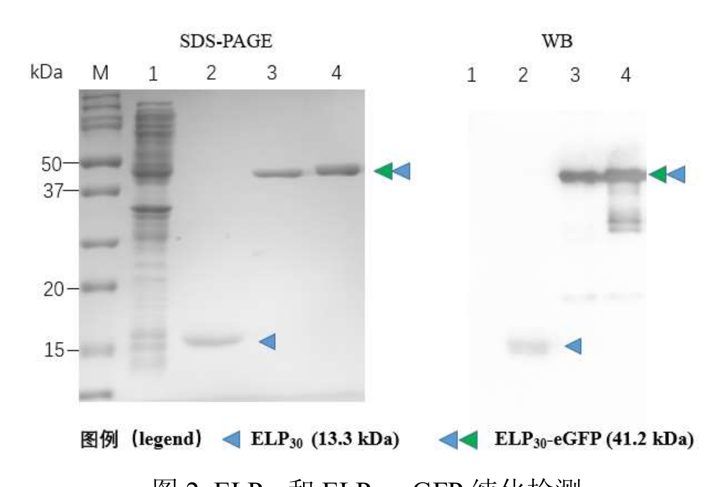


图 2 ELP_{30} 和 ELP_{30}-eGFP 纯化检测

Fig.2 Purification of ELP_{30} and ELP_{30}-eGFP

M: Protein maker; 1: uninduced cell extract; 2: purification of ELP_{30} via ELP_{30}-tag; 3: purification of ELP_{30}-eGFP via ELP_{30}-tag; 4: purification of ELP_{30}-eGFP via His-tag

2.2.2 ELP_{30}-intein1-eGFP 和 eGFP-intein2-ELP_{30} 纯化检测

为避免纯化标签对目的蛋白结构和功能的影响，纯化标签常在蛋白纯化完成后去除，为此，本实验在目的蛋白 eGFP 和 ELP_{30}-tag 间引入了内含肽，构成 EI tag-eGFP，其中：intein1 突变自 *Ssp* DnaB intein，可在中性 pH 环境中特异性断裂 C 端肽键；intein2 突变自 *Mxe* GyrA intein，可受巯基试剂诱导特异性断裂 N 端肽键[14]。因此，EI tag-eGFP 可先通过 ITC 纯化，再诱导 intein 断裂，释放目的蛋白 eGFP，最后通过 ITC 去除 EI tag，获得 eGFP。

ELP_{30}-intein1-eGFP（58.9 kDa）和 eGFP-intein2-ELP_{30}（62.5 kDa）纯化产物

肉眼可见绿色荧光，在激发光下荧光明亮（图 5）。SDS-PAGE 检测显示 ELP_{30}-intein1-eGFP 纯化产物的带型更为复杂（图 3 泳道 3），未能成功纯化；结合以 His-tag 抗体为一抗的 Western blotting 检测发现：大量重组蛋白在诱导表达阶段出现了胞内自切割（in vivo cleavage）现象，断裂为 ELP_{30}-intein1（31 kDa）和 eGFP（27.9 kDa ，在 C 端融合了一段载体编码的 His-tag）两部分（图 3 泳道 2），因此 ITC 时，ELP_{30}-intein1 将与 ELP_{30}-intein1-eGFP 共同相变，理论上，无法纯化得到单独的 ELP_{30}-intein1-eGFP。此外，纯化产物中，在对应 ELP_{30}-intein1 和 ELP_{30}-intein1-eGFP 的蛋白条带之间检出了一条杂带，该条带代表的蛋白具有两个重要属性：具有可逆相变性质，能经多次 ITC 纯化并出现在最终纯化产物中；可被以 His-tag 抗体为一抗的 Western blotting 检出。结合分子量大小，可以推测：ELP_{30}-intein1-eGFP 在蛋白诱导表达阶段，部分 intein1 自我切除，形成了 ELP_{30}-eGFP（40.2 kDa），经过多次 ITC 后仍混在纯化产物中，并且由于在 C 端融合了载体序列编码的 His-tag，该蛋白可被 Western blotting 检出。第三次 ITC 时，洗脱液由 Buffer A（pH 8.5）换为 PBS（pH 7.0），溶液 pH 的变化诱导了部分重组蛋白 intein1 的 C 端肽键断裂（断裂率：59.7%），释放出与 intein1 C 端融合表达的 eGFP（图 3 泳道 4），但再次 ITC 后，释放的 eGFP 在滤膜截留物中检出（图 3 泳道 5），滤液经终浓度 10%的三氯乙酸处理后未发现蛋白沉淀。

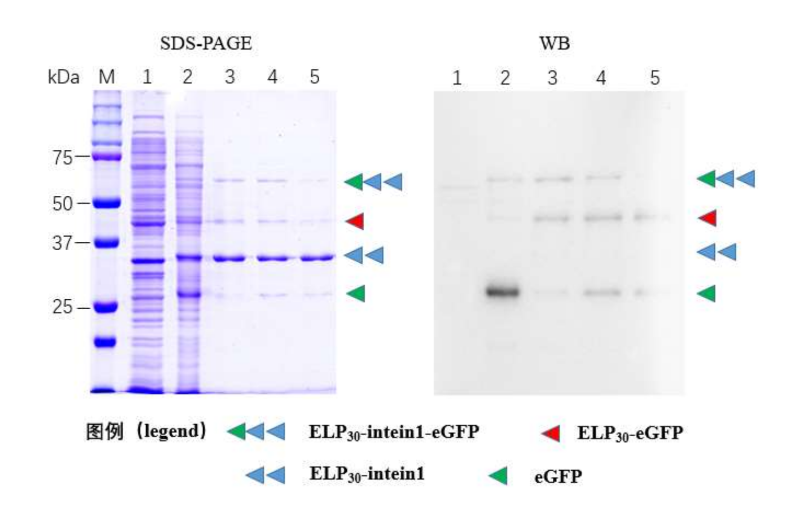


图 3 ELP_{30}-intein1-eGFP 纯化及切割产物检测

Fig.3 Purification and cleavage of ELP_{30}-intein1-eGFP

M: Protein maker; 1: uninduced cell extract; 2: supernatant of lysate of ELP_{30}-intein1-eGFP, 3: ELP_{30}-intein1-eGFP purification via ELP_{30}-tag; 4: cleavage products of ELP_{30}-intein1-eGFP induced by pH shift; 5: eluate gained by another ITC operation after the cleavage

eGFP-intein2-ELP30 纯化产物经 SDS-PAGE 检测，软件分析，条带纯度达 92%（图 4 泳道 3），蛋白浓度为 0.29 mg/mL（见表 2）。以 GFP 抗体为一抗的 Western blotting 检测显示：少量重组蛋白在诱导表达时出现了胞内自切割现象，断裂为 eGFP（26.9 kDa）和 intein2-ELP30（35.6 kDa）两部分（图 4 泳道 2）。纯化产物经 DTT 诱导后，部分重组蛋白 intein2 的 N 端肽键断裂（断裂率：54.7%），释放出与 intein2 N 端融合表达的 eGFP（图 4 泳道 4），但再次 ITC 后，释放的 eGFP 在滤膜截留物中检出（图 4 泳道 5），滤液经终浓度 10%的三氯乙酸处理后未发现蛋白沉淀。

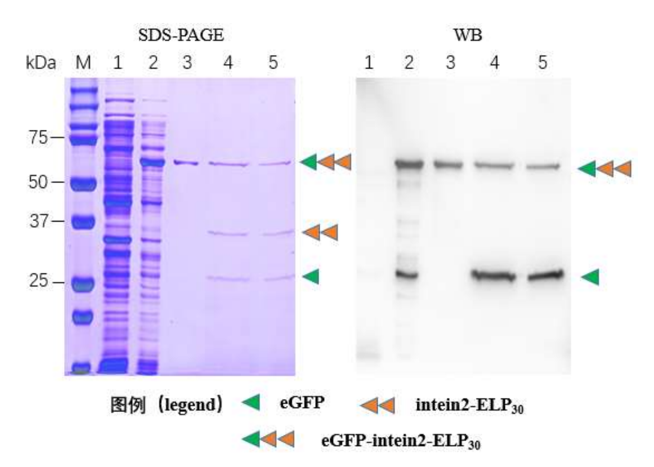


图 4 eGFP-intein2-ELP30 纯化及切割产物检测

Fig.4 Purification and cleavage of eGFP-intein2-ELP30

M: Protein maker; 1: uninduced cell extract; 2: supernatant of lysate of eGFP-intein2-ELP30, 3: eGFP-intein2-ELP30 purification via ELP30-tag; 4: cleavage products of eGFP-intein2-ELP30 induced by DTT; 5: eluate gained by another ITC operation after the cleavage

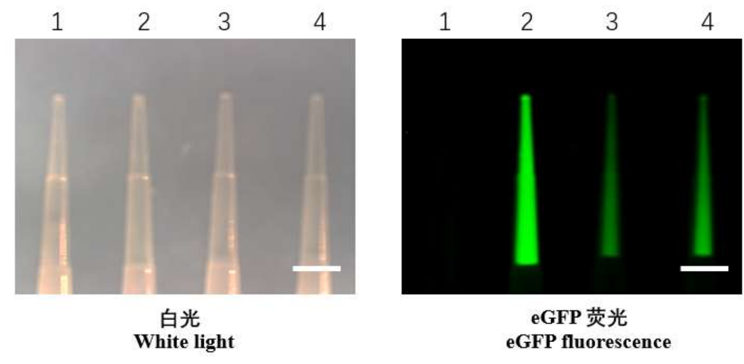


图 5 重组蛋白纯化产物荧光活性检测

Fig.5 Detection of fluorescence activity of recombinant proteins

A: PBS (used as negative control); B: ELP30-eGFP;

C: ELP30-intein1-eGFP; D: eGFP-intein2-ELP30.

White scale bar represents 1 mm

3 讨论

现已报道的相同设计的 ELP_{90}（n=90）的 Tt 为 51℃（PBS 中），且 n 值越小，Tt 越高[3]。因此，在同等测量条件下，本实验所选用的 ELP_{30} 的 Tt 将大于 51℃，但由于 ELP 的 Tt 可受溶液中盐离子种类和浓度的调节，通过向样品溶液中加入一定浓度的盐离子，可以将 Tt 降至室温以下，以便能在室温环境触发 ELP 相变，对 ELP 重组蛋白进行 ITC 纯化，无需任何加热操作[15]。本实验通过向样品中添加终浓度 4 mol/L 的 NaCl，在室温触发了所有重组蛋白的相变，经三次 ITC 操作，成功纯化得到 ELP_{30}、ELP_{30}-eGFP 和 ELP_{30}-intein1-eGFP，且蛋白条带的纯度均达 90%以上，其中 ELP_{30}-tag 对 ELP_{30}-eGFP 的纯化效果甚至优于 His-tag。所有重组蛋白均进行了 3 轮 ITC（ITC-1、ITC-2 和 ITC-3），重组蛋白回收率分析结果见表 2，每次 ITC 均有少量重组蛋白损失，回收率逐次下降，最终回收率在 61%-72%。实验过程中，滤膜和注射器中均会滞留一定体积的样品，这可能是造成重组蛋白回收率逐次降低的主要原因。

表 2 重组蛋白回收率分析

Table 2 Recovery rate analysis of recombinant proteins

重组蛋白	重组蛋白回收率			蛋白浓度
	ITC-1	ITC-2	ITC-3	（mg/mL，ITC-3）
ELP_{30}	93%	70%	61%	0.18
ELP_{30}-eGFP	96%	84%	65%	0.44
eGFP-intein2-ELP_{30}	95%	88%	72%	0.29

ELP 标签常见的使用策略为离心法：先触发样品溶液中 ELP 重组蛋白相变析出，通过离心，收集 ELP 重组蛋白沉淀，再用低温（T<Tt）缓冲液溶解，重复上述操作，直至重组蛋白纯度较为理想[3]。相比本实验中所描述和采用的滤膜截留法，离心法在操作上更为便捷，但我们使用离心策略，经三次相变循环后重组蛋白条带纯度仍然较低，未能纯化得到 ELP 重组蛋白（数据未显示），原因不明。

特异性蛋白酶常用于重组蛋白的标签去除，避免标签对目的蛋白结构和功能的影响，但蛋白酶价格昂贵，稳定性差，反应温度苛刻，存在非特异性酶切等缺点，并且在酶切反应完成后，需要额外的层析步骤将蛋白酶去除，相比之下，内含肽具有断裂诱导条件简单、断裂位点特异和不向反应体系中引入蛋白杂质等优点，被视为蛋白酶的潜在替代品[16]。本实验使用了两种内含肽：intein1 和 intein2，

两种内含肽在蛋白诱导表达时均出现了不同程度的胞内自切割现象，导致可收获蛋白量降低，这也是 intein 应用时的常见问题[11,14]。为克服 intein 的这一缺点，可通过调整目的蛋白与 intein 相连处的氨基酸序列，抑制胞内自切割反应[14]。含有二硫键的目的蛋白不宜用高浓度 DTT 的处理，可使用羟胺（hydroxylamine）来诱导 intein2 这类内含肽的断裂而避免 DTT 对目的蛋白分子内二硫键的破坏[16]；此外，还可采用内含肽拆分策略（split-intein method），将 intein 拆分为两个无活性部分，分别表达、纯化，当两部分重新结合后，intein 可恢复自切割活性，释放融合表达的目的蛋白，这一方法可从根本上解决胞内自切割问题和避免 DTT 对目的蛋白结构的破坏[17]。本实验成功诱导了两种内含肽的断裂，释放出 eGFP，但再次 ITC 后，滤液经终浓度 10%的三氯乙酸处理后未发现蛋白沉淀，释放的 eGFP 在滤膜截留物中检出，其原因不明，这还有待于进一步的研究。

总之，本实验在大肠杆菌中表达了带有 ELP_{30}-tag 的重组蛋白并通过 ITC 操作成功纯化得到除 ELP_{30}-intein1-eGFP 外的重组蛋白，且所有融合表达 eGFP 的重组蛋白纯化产物均具有荧光活性。此外，使用两种内含肽元件，构建了 EI tag，成功诱导了内含肽的断裂，释放出 eGFP，这为小分子量的 ELP tag 及衍生的 EI tag 的应用和进一步优化设计奠定了基础。

参考文献

[1] Urry D W, Trapane T L, Prasad K U. Phase-structure transitions of the elastin polypentapeptide-water system within the framework of composition-temperature studies. Biopolymers, 1985, 24(12):2345-2356.
[2] Mcpherson D T, Morrow C, Minehan D S, et al. Production and purification of a recombinant elastomeric polypeptide, G-(VPGVG) 19-VPGV, from Escherichia coli. Biotechnology Progress, 1992, 8(4):347-352.
[3] Meyer D E, Chilkoti A. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. Nature Biotechnology, 1999, 17(11):1112-1115.
[4] Mcpherson D T, Xu J, Dan W U. Product purification by reversible phase transition following escherichia coli expression of genes encoding up to 251 repeats of the elastomeric pentapeptide GVGVP. Protein Expression & Purification, 1996, 7(1):51-7.
[5] Banki M R, Feng L, Wood D W. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. Nature Methods, 2005, 2(9):659-661.
[6] Trabbiccarlson K, Liu L, Kim B, et al. Expression and purification of recombinant proteins from Escherichia coli: Comparison of an elastin-like polypeptide fusion with an oligohistidine fusion. Protein Science, 2004, 13(12):3274–3284.
[7] Banki M R, Wood D W. Inteins and affinity resin substitutes for protein purification and scale up. Microbial Cell Factories, 2005, 4(1):32-37.
[8] Ge X, Trabbic-Carlson K, Chilkoti A, et al. Purification of an elastin-like fusion protein by microfiltration. Biotechnology & Bioengineering, 2006, 95(3):424-432.
[9] Schipperus R, Teeuwen R L M, Werten M W T, et al. Secreted production of an elastin-like polypeptide by Pichia pastoris. Applied Microbiology & Biotechnology, 2009, 85(2):293-301.
[10] Lin M, Rose-John S, Grötzinger J, et al. Functional expression of a biologically active fragment of soluble gp130 as an ELP-fusion protein in transgenic plants: purification via inverse transition cycling. Biochemical Journal, 2006, 398(3):577-583.
[11] Li Tian, Samuel S. M. Sun. A cost-effective ELP-intein coupling system for recombinant protein purification from plant production platform. Plos One, 2011, 6(8): e24183.
[12] 李敏，杨谦. 一种高效构建同源重组 DNA 片段的方法——融合 PCR. 中国生物工程杂志，2007, 27(8): 53-58.
[13] Meyer D E, Chilkoti A. Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive directional ligation: examples from the elastin-like polypeptide system. Biomacromolecules, 2002, 3(2):357-367.
[14] Jr E T, Benner J, Xu M Q. The cyclization and polymerization of bacterially expressed proteins using modified self-splicing inteins. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(26):18359-18363.
[15] Cho Y, Zhang Y, Christensen T, et al. Effects of hofmeister anions on the phase transition temperature of elastin-like polypeptides. Journal of Physical Chemistry B, 2008, 112(44):13765-13771.
[16] Chong S, Mersha F B, Comb D G, et al. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. Gene, 1997, 192(2):271-81.
[17] Shi C, Han T C, Wood D W. Purification of microbially expressed recombinant proteins via a

dual ELP split intein system. Methods in Molecular Biology, 2017, 1495:13-25.

Studies on the Protein Purification Ability of an ELP_{30}-Tag in Prokaryotic Expression System

CHEN Yuan-qiao[1] LONG Ding-pei[2] DOU Xiao-xue[1] QI Run[1] ZHAO Ai-chun[1, 2]

(1 College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2 State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Chongqing 400716, China)

Abstract Objective: Exploration of the purification efficiency of proteins in prokaryotic expression system (*Escherichia coli*) by using an elastin-like protein tag (ELP_{30}-tag) with small molecular weight. Methods: The *ELP_{30}-tag* gene was synthesized and inserted into the pET-28a (+) vector, two *intein* genes (*intein1* & *intein2*) and an enhanced green fluorescent protein (eGFP) gene were cloned and applied to construct four prokaryotic expression vectors: pET-ELP_{30}, pET-ELP_{30}-eGFP, pET-ELP_{30}-intein1-eGFP and pET-eGFP-intein2-ELP_{30}. All the recombinant plasmids were transferred into *E. coli* BL21(DE3) and induced by IPTG, respectively. Recombinant proteins ELP_{30}, ELP_{30}-eGFP, ELP_{30}-intein1-eGFP and eGFP-intein2-ELP_{30} were purified by inverse transition cycling (ITC), and then the cleavage reaction of intein1 and intein2 were induced by adjusting the pH value of the solution or adding DL-Dithiothreitol (DTT), respectively, and last the pure eGFPs were separated by ITC reaction. Results: The recombinant proteins ELP_{30}, ELP_{30}-eGFP and eGFP-intein2-ELP_{30} were purified by using the designed ELP_{30}-tag; the cleavage reaction of inteins from the recombinant proteins ELP_{30}-intein1-eGFP and eGFP-intein2-ELP_{30}, which could be successfully induced, and then the eGFPs were released into the solution but not separated. This study lays some foundations for the application and optimization of the ELP-tags with small molecular weight.

Key words: Elastin-like protein (ELP) Intein Enhanced green fluorescent protein (eGFP) Prokaryotic expression Protein purification